

**ВЛИЯНИЕ МИКРОСПОРИДИОЗА НА СОСТАВ БЕЛКОВ
В ЖИРОВОМ ТЕЛЕ И ГЕМОЛИМФЕ СВЕРЧКОВ
GRYLLUS BIMACULATUS**

© К. В. Селезнев, О. А. Антонова, И. В. Исси

В серии электрофорезов показано: 1) накопление белка MW 110 kDa в жировом теле всех зараженных насекомых; 2) исчезновение группы мажорных белков, предположительно резервных белков, основным из которых является белок MW 60 kDa, из жирового тела зараженных взрослых самцов, личинок обоих полов и самок первого дня после линьки на имаго; 3) незначительное накопление группы белков MW от 100 до 220 kDa предположительно вителлогенинов в гемолимфе зараженных половозрелых самок; 4) исчезновение из гемолимфы зараженных самок белка MW 90 kDa.

Работ по изучению изменения состава белков у зараженных животных при микроспориidioзе практически нет. Вероятная причина этого заключается в невозможности дифференциации белков хозяина от белков паразита. Разработанная нами методика выделения внутриклеточных стадий микроспоридий (Seleznev e. a., 1995) позволяет различать вновь образовавшиеся белки хозяина от белков паразитов (Селезнев и др., 1994а).

В настоящей работе приведены результаты изучения изменения состава белков жирового тела и гемолимфы у здоровых и зараженных личинок и взрослых сверчков *Gryllus bimaculatus* при заражении их микроспоридией *Nosema grylli*.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили сверчки *Gryllus bimaculatus*, зараженные микроспоридией *Nosema grylli*, любезно предоставленные сотрудниками инсектария ИЭФиБ им. И. М. Сеченова РАН. Сверчков содержали по методу Князева (1985).

Для работы с белками был использован SDS электрофорез в полиакриламидном геле. Гели фиксировали в смеси 40 %-го метанола и 20 %-ной уксусной кислоты в течение 40 мин и окрашивали в смеси 0.2 %-го Кумаси (Coomassie brilliant blue R), 40 %-го метанола, 10 %-ной уксусной кислоты в течение 20 мин. Для определения молекулярного веса белков были использованы маркеры молекулярного веса (Low Molecular Weight (LMW) Calibration Kit (Farmacia)).

Гемолимфу собирали в эппендорфы из ранки на брюшке предварительно охлажденных насекомых и быстро смешивали с буфером (0.098 M NaOH, 0.148 M NaCl, 0.017 M EDTA и 0.041 M лимонная кислота (pH 4.5)) для предотвращения коагуляции гемолимфы. После сбора достаточного количества гемолимфы пробы центрифугировали при 8000 об./мин на настольной центрифуге для удаления клеточных элементов, определяли концентрацию белков в супернатанте и из отобранного супернатанта быстро приготавливали пробы для электрофореза с уравненной концентрацией в каждой из них. Всего было тестировано 32 пробы.

Для получения проб из жирового тела вскрывали сверчка и отобранный орган разрушали в гомогенизаторе с тефлоновым пестиком в фосфатно-солевом буфере (PBS: 138 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 8 mM Na_2HPO_4 , pH 6.8), предотвращающим разрушение преспоровых стадий развития микроспоридий (Seleznev e. a., 1995). Гомогенаты центрифугировали при 8000 об./мин на настольной центрифуге,

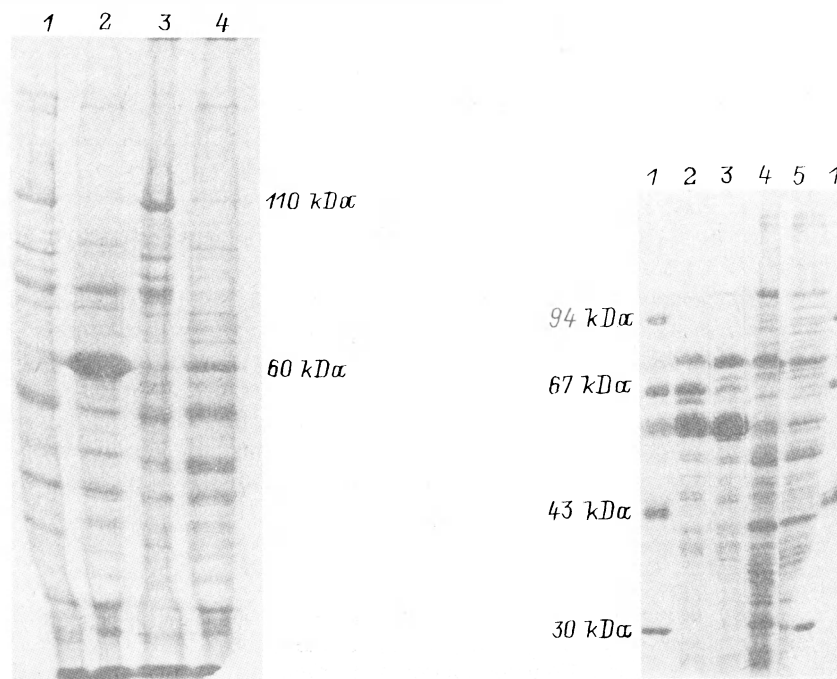


Рис. 1. Электрофореграмма гомогенатов жирового тела половозрелых сверчков.

1 – жировое тело зараженных самцов, 2 – здоровых самцов; 3 – жировое тело зараженных самок, 4 – здоровых самок.

Fig. 1. Electrophoresis of female fat body homogenates.

Рис. 2. Электрофореграмма гомогенатов жирового тела здоровых и зараженных личинок и имаго обоих полов.

1 – маркеры молекулярного веса; 2 – жировое тело здоровых личинок самок, 3 – здоровых личинок самцов; 4 – жировое тело зараженных личинок самок, 5 – зараженных личинок самцов.

Fig. 2. Electrophoresis of fat body of healthy and infected larvae and imago.

определяли концентрацию белков в каждой пробе и из отобранного супернатанта быстро приготавливались пробы для электрофореза с уравненной концентрацией в каждой из них. Всего было тестировано 49 проб.

Результаты и обсуждение. Накопление белка MW 110 kDa в жировом теле зараженных насекомых. В серии электрофорезов гомогенатов жирового тела зараженных и незараженных сверчков показано, что заражение жирового тела микроспоридиями приводило к накоплению белка MW 110 kDa в зараженном органе у самок, самцов и личинок обоих полов (рис. 1, 2).

Серия электрофореграмм нескольких фракций (рис. 3), полученных методом очистки преспоровых стадий развития микроспоридий (Селезнев и др., 1994б; Seleznev e. a., 1995), свидетельствует о том, что белок MW 110 kDa является белком насекомого-хозяина, а не микроспоридий. Он отсутствует среди цитоплазматических белков преспоровых стадий и спор микроспоридий.

Исчезновение группы мажорных белков из жирового тела зараженных личинок. В жировом теле здоровых взрослых самцов, личинок

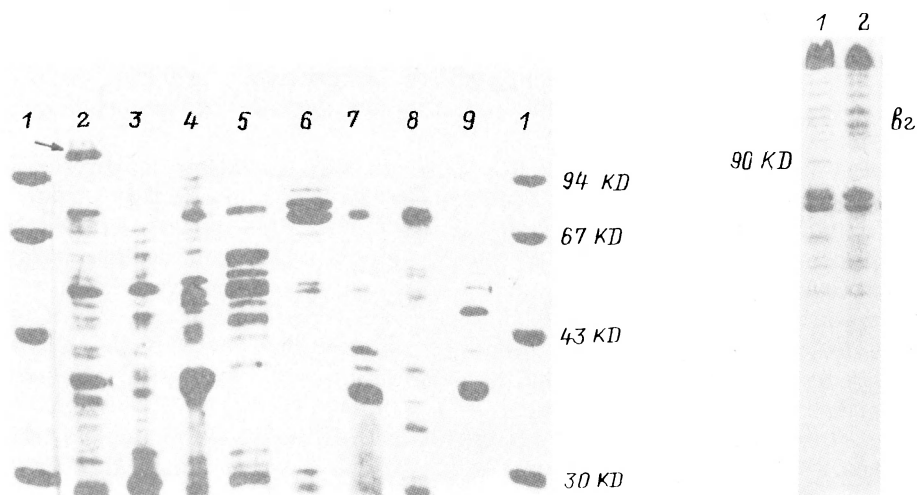


Рис. 3. Электрофореграммы различных фракций, полученных методом очистки преспоровых стадий развития микроспоридий.

1 – маркеры молекулярного веса; 2 – жировое тело зараженных самок; 3 – центрифужный осадок после получения фракции N 2; 4 – жировое тело здоровых самок; 5 – центрифужный осадок после получения фракции N 4; 6 – очищенные преспоровые стадии развития микроспоридий; 7 – центрифужный осадок после обработки преспоровых стадий развития лизирующим буфером; 8 – цитоплазматическая фракция белков из спор, разрушенных гомогенизированием; 9 – поверхностные белки стенки спор микроспоридий. Стрелка – белок MW 110 kDa.

Fig. 3. Electrophoresis of different samples separated by the method of purification of different life cycle stages of microsporidia *Nosema grylli*.

Рис. 4. Электрофореграмма белков гемолимфы взрослых сверчков.

1 – гемолимфа незараженных самок; 2 – гемолимфа зараженных самок.

Fig. 4. Electrophoresis of hemolymph of adult crickets.

обоих полов и самок, взятых в первый день после линьки на имаго, обнаружена группа мажорных белков, основным из которых являлся белок MW 60 kDa (рис. 1, 2). К 5-му дню у здоровых самок этот белок исчезает. У личинок количество этих белков так велико, что они практически скрывают все остальные белки (рис. 2). У зараженных насекомых показано исчезновение этих белков из жирового тела (рис. 1, 2).

По литературным данным (Keeley, 1985), белки, присутствующие в таком количестве в жировом теле личинок насекомых, представляют собой резервные белки. Они, являясь запасными питательными веществами, служат источником аминокислот и азота при гистогенезе во время метаморфоза (Keeley, 1985). По нашему предположению, белок MW 60 kDa и группу сопутствующих мажорных белков также можно отнести к резервным белкам.

Накопление вителлогенинов в гемолимфе зараженных половозрелых самок. В серии электрофорезов белков гемолимфы как зараженных, так и незараженных половозрелых самок показано незначительное накопление группы белков MW от 100 до 220 kDa при микроспориidioзе (рис. 4). Эти белки отсутствовали во всех пробах гемолимфы, взятых от личинок и самцов. По молекулярным весам они соответствуют вителлинам, полученным нами из зрелых яиц по методу, описанному Кэмп-Томмом и др. (Kemp-Tomm et al., 1990). По-видимому, несмотря на заражение жирового тела микроспоридиями, исчезно-

вения вителлогенинов из гемолимфы вследствие общего истощения сверчков не происходит. Мы объясняем этот феномен редукцией яичников при микроспориidioзе (Селезнев и др., 1996) и прекращением вследствие этого абсорбции ими вителлогенинов. Однако это предположение требует дальнейшей экспериментальной проверки.

Исчезновение белка MW 90 kDa из гемолимфы зараженных половозрелых самок. Кроме вителлогенинов в гемолимфе был обнаружен другой белок MW 90 kDa, исчезающий у зараженных самок (рис. 4). Как и вителлогенины, этот белок отсутствует на электрофореграммах гемолимфы самцов и личинок обоих полов. По данным Кэмп-Томма и др. (Kemp-Tomm e. a. 1990), белок подобной массы присутствует на электрофореграммах белков, полученных из яиц сверчков методом, используемым для очистки вителлинов. Однако авторы не обозначают его как вителлогенин, по всей видимости, потому что он не отвечает на антитела против этих белков.

Коллектив авторов выражает глубокую благодарность сотрудникам отдела клеточных культур Института цитологии РАН Б. А. Маргулису, А. В. Киневу, А. П. Воронину, сотрудникам ИЭФиБ им. И. М. Сеченова Е. М. Ружейниковой, А. Н. Князеву, В. П. Иванову и сотруднику ВИЗР В. В. Долгих за помощь и поддержку, оказанную нам при проведении этой работы.

Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ, № 94-04-12972).

Список литературы

- Князев А. Н. Пикл развития сверчка *Gryllus bimaculatus*, 1985 Deg. (Orthoptera, Gryllidae) в условиях лабораторного содержания // Энтомол. обозр. 1985. Т. 64, вып. 1. С. 58-73.
- Селезнев К. В., Долгих В. В., Маргулис Б. Н. Некоторые особенности изменения белкового состава жирового тела сверчков *Gryllus bimaculatus* при заражении микроспоридией *Nosema grylli* sp. n. // Актуальные вопросы медицинской паразитологии. С.-Петербург: ВМА, 1994а. С. 50.
- Селезнев К. В., Исси И. В., Долгих В. В., Соколова Ю. Я., Белостоцкая Г. Б., Антонова О. А. Очистка различных стадий жизненного цикла микроспоридии *Nosema grylli* из сверчков *Gryllus bimaculatus* центрифугированием в градиенте плотности Перкола // Паразитология. 1994б. Т. 28, вып. 4. С. 298-302.
- (Селезнев К. В. и др.) Seleznirov K. V., Issil V., Dolgikh V. V., Sokolova J. J., Belostotskaya G. B., Antonova O. A. Fractionation of different life cycle stages of microsporidia *Nosema grylli* from crickets *Gryllus bimaculatus* by centrifugation in Percoll density gradient for biochemical research // J. Euk. Microbiol. 1995. Vol. 42, N 3. P. 288-292.
- Селезнев К. В., Антонова О. А., Исси И. В. Микроспоридиоз сверчков *Gryllus bimaculatus* (Gryllidae), вызванный микроспоридией *Nosema grylli* (Nosematidae). // Паразитология. 1996. Т. 30, вып. 3. С. 250-262.
- Keeley L. L. Physiology and biochemistry of the fat body // Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology. Vol. 3. Pergamon Press, 1985. P. 211-248.
- Kemp-Tomm S., Hoffmann K. H., Engelmann F. Vitellogenins and vitellins of the Mediterranean field cricket, *Gryllus bimaculatus*: isolation, characterization and quantification // Physiol. Entomology. 1990. Vol. 15. P. 167-178.

ВИЗР, С.-Петербург, 189620

Поступила 20.09.1996

AN INFLUENCE OF MICROSPORIDIOSIS
ON THE PROTEIN PATTERN IN A FAT BODY AND HAEMOLYMPH
OF THE CRICKETS *GRYLLUS BIMACULATUS*

K. V. Seleznev, O. A. Antonova, I. V. Issi

Key words: Microsporidia, *Nosema grylli*, *Gryllus bimaculatus*, fat body, haemolymph, protein.

SUMMARY

The influence of the microsporidiosis caused by *Nosema grylli* on the protein patterns in the fat body and haemolymph of *Gryllus bimaculatus* is discussed. By means of an electrophoresis several changes in the protein patterns were found out: 1) the accumulation of some protein MW 110 kDa in the fat body, 2) the disappearance of the group of the major fat body proteins with the main one of MW 60 kDa, 3) insignificant accumulation of the group of proteins of MW from 100 to 220 kDa in haemolymph, 4) disappearance of MW 90 kDa protein in the haemolymph.
